

Das Vorkommen von Insulinantikörpern und die Beeinflussung dieser Insulineiweißbindung durch Sulfonylharnstoff und Glycodiazin

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Friedrich-Alexander-Universität
zu
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Karin Schnell
aus Königsberg

1967



Dekan: Professor Dr. K. G. Ober

Referent: Professor Dr. F. Scheiffarth

Tag der mündlichen Prüfung: 8. April 1967

Aus der Abteilung für klinische Immunologie des Universitätskrankenhauses
(Vorstand: Prof. Dr. F. Scheiffarth), Erlangen-Nürnberg, Deutschland

Das Vorkommen von Insulinantikörpern und die Beeinflussung dieser Insulineiweißbindung durch Sulfonylharnstoff und Glycodiazin

Von F. SCHEIFFARTH, F. WEIST, H. WARNATZ und K. SCHNELL

Einleitung

Unter den zahlreichen Faktoren, die für einen erhöhten Insulinbedarf verantwortlich gemacht werden (1, 3, 5, 6, 20, 23, 24, 30, 32), kommt den Insulinantikörpern, die vornehmlich nach Langzeitbehandlung von Diabetikern auftreten, eine besondere Bedeutung zu (7, 8, 12, 17, 27, 29, 31). Sie zeichnen sich durch ein höheres spezifisches Bindungsvermögen für Insulin (8, 14, 17) gegenüber normalen Serumproteinen aus und konnten auf Grund ihres besonderen elektrophoretischen Verhaltens und ihrer Sedimentationseigenschaften bei Analyse in der Ultrazentrifuge charakterisiert werden (2, 4, 9–11, 16, 23, 36).

Mit der Differentialadsorptionsmethode nach *Kerp und Steinhilber* (14) sollte nun geprüft werden, inwieweit eine Dysproteinämie im Bereich der α - und γ -Globuline die Bindungsfähigkeit des Serums für Insulin beeinflusst und ob eine Applikation von Sulfonylharnstoff bzw. Glycodiazin (18) *in vivo* und *in vitro* (34) eine Antikörpertiterveränderung herbeizuführen vermag. Die Untersuchungen erfolgten bei verschiedenen Diabetikergruppen mit einem Insulinbedarf von 20–500 Einheiten pro die. Es sollte ein kasuistischer Beitrag zur Frage des Vorkommens von Insulinantikörpern in Abhängigkeit von Insulindosis und Behandlungszeit geliefert werden.

Kasuistik und Methodik

In einer ersten Versuchsreihe wurden nach der Methode von *Kerp und Steinhilber* (14) Seren verschiedener Diabetikerkollektive auf ihren Gehalt an Insulinantikörpern untersucht. Das Krankengut von 149 Patienten wurde hierbei nach folgenden Kriterien aufgeteilt, und die Zahlen in Klammern bedeuten die Anzahl der Patienten, bei denen zusätzlich vor und nach Sulfonylharnstoff- bzw. Glycodiazinapplikation Insulinantikörperbestimmungen erfolgten.

Eingegangen: 2. Mai 1967.

- 11 (8) Patienten ohne Diabetes (Kontrollgruppe).
- 20 (10) Patienten mit Dysproteinämie (α -Globulinvermehrung über 9,5 rel.% oder γ -Globulinvermehrung über 22 rel.%).
- 3 (3) Patienten mit latentem Diabetes.
- 25 (6) Patienten mit einem leichten Diabetes (Einstellung mit Sulfonylharnstoffen oder bis 20 I.E. Insulin pro die).
- 68 (5) Patienten mit einem mittelschweren Diabetes (20—60 Einheiten pro die).
- 22 (4) Patienten mit einem schweren Diabetes (Insulinbedarf 60—200 I.E./Tag). Bei einer Patientin handelt es sich um einen insulinresistenten Fall, die Patientin bekam eine Tagesdosis von 500 Einheiten Insulin.

Bei den Sulfonylharnstoff- bzw. Glycodiazinbelastungen erfolgten neben den Insulintiterbestimmungen auch Blutzuckerkontrollen jeweils vor sowie 20, 30 und 60 Minuten nach der intravenösen Sulfonylharnstoff- bzw. Glycodiazinapplikation.

Zur Bestimmung der Insulinantikörper kam die Differentialadsorption nach *Kerp und Steinhilber* (14) zur Anwendung. Hierbei wird in ein Reagenzglas A (10×100 mm) 100 mg eines Cellulosepulvers eingewogen. Dieses Adsorbens vermag Insulin aus einem 0,04 M Phosphatpuffer mit einem Humanalbumin-Zusatz bei pH 8,0 im Konzentrationsbereich von $7,58 \times 10^{-9}$ M bis $7,58 \times 10^{-7}$ M konstant (94%) zu adsorbieren. Der Humanalbumin-Zusatz von 0,25% ($3,85 \times 10^{-5}$ M) dient der Vermeidung größerer Insulinverluste durch Adsorption an die Glaswand. Die Pufferlösung, von der 1 ml in jedes Röhrchen pipettiert wird, enthält weiterhin 1 mE = $7,58 \times 10^{-9}$ M J^{131} -Insulin/ml. Für die Prüfung der einzelnen Seren auf Insulinantikörper verwendeten wir mindestens 3 (von 5, 10, 20 und in einzelnen Fällen auch 50% Serum), vereinzelt auch neun verschiedene Serumverdünnungen, in jeweils 1 ml J^{131} -Insulin-Phosphat-Humanalbumin-Puffer der oben angegebenen Zusammensetzung. Das Reaktionsgemisch wurde nach Zugabe der Patientenseren 5 Minuten geschüttelt und danach 12 bis maximal 20 Stunden bei 4° C inkubiert. Nach Abzentrifugierung (2—3mal) des Adsorptionsmittels pipettierten wir 0,5 ml, d. h. die Hälfte des Überstandes in das zweite Reagenzglas B. Hierbei mußte man beachten, daß bis zum Abpipetieren des Überstandes die Lösungen bei konstanter Temperatur aufbewahrt wurden. Um den J^{131} -Insulingehalt in den Reagenzgläsern A und B zu bestimmen, mißt man die Radioaktivität in einem Bohrloch-Szintillationszähler. Der Antikörpertiter wird als diejenige Serummenge in ml definiert, die 0,5 mE J^{131} -Insulin¹ zu binden vermag. Zum Erhalt des Antikörpertiters trägt man in einem semilogarithmischen Koordinatensystem die Menge an antikörpergebundenem Insulin in Abhängigkeit von der Serumkonzentration auf. Hierbei erhält man die S-förmige Titrationskurve, die in ihrem mittleren Abschnitt idealisierend durch eine Gerade ersetzt werden kann. Der Schnittpunkt dieser Geraden mit der Parallelen zur x-Achse, $y = 0,5$ mE, ergibt auf der Abszisse den gesuchten Titerwert.

¹ Wir danken den Farbenfabriken Bayer AG, Leverkusen, für die mehrfache Überlassung von J^{131} -Insulin.

Ergebnisse

Zum Ausschluß methodischer Fehler wurde bei je einem Patienten ohne Diabetes und einem mit erhöhtem Insulinbedarf (52 Einheiten) die Insulinbindungsfähigkeit des jeweiligen Serums titriert. Die erhaltenen Titrationskurven sind in Abb. 1 wiedergegeben. Demnach entspricht ein Titer von $152 \mu\text{l}$ dem Wert eines insulinbehandelten Diabetikers. Bei der pankreasgesunden Kontrollgruppe sowie bei den Dysproteinämikern fanden sich keine pathologischen Titer. Hier lag der Titerbereich über $670 \mu\text{l}$. Bei der Gruppe mit latentem Diabetes fanden sich ebenfalls normale Titer. Bei den Diabetikern, die täglich bis zu 60 Einheiten Insulin erhalten hatten, betrugen die Titer zwischen 115 bzw. $335 \mu\text{l}$, d. h. sie bewegten sich im Bereich der insulinbehandelten Diabetiker nach Kerp (14). Lediglich eine Patientin, die schon längere Zeit mit Insulin behandelt worden war und zum Zeitpunkt der Untersuchung täglich 60 Einheiten Insulin bekam, hatte mit $69 \mu\text{l}$ einen

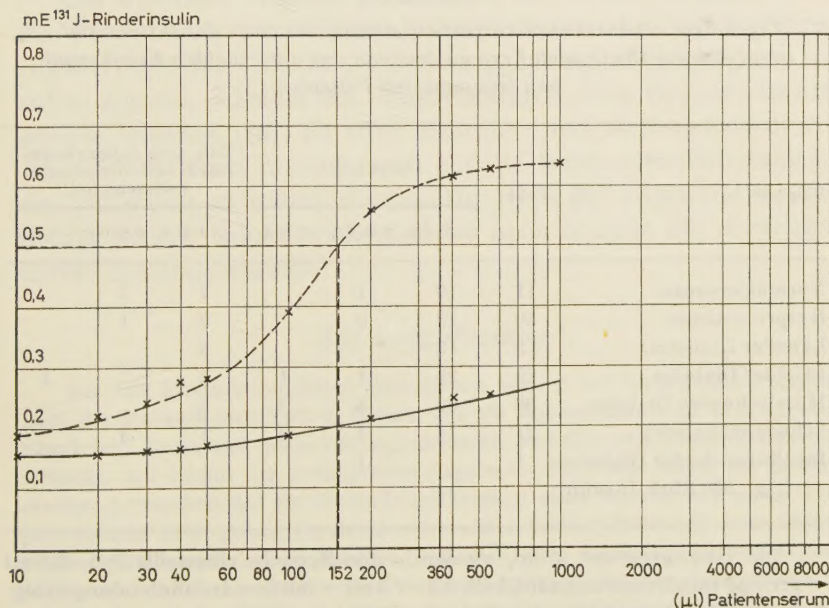


Abb. 1. Insulinbindungskurven eines Normalserums und eines Patienten mit Diabetes in Abhängigkeit von der Serumkonzentration. Dabei entspricht der Titer von $152 \mu\text{l}$ dem Serum eines insulinbehandelten Diabetikers (s. Verlauf der oberen Kurve).

Titer, der zwischen dem eines insulinbehandelten Diabetikers und dem einer Insulinresistenz liegt. Bei Diabetikern, die 60—200 Einheiten Insulin täglich benötigten und im Durchschnitt 3 bis 5 Jahre behandelt worden waren, zeigten nur 3 von 21 einen Titer unter 300 μ l. Das Serum einer Patientin mit einem klinisch insulinresistenten Diabetes (500 Einheiten Schweineinsulin pro die) lag bei 440 μ l. Demnach ließen sich zwischen Insulindosis, Behandlungsdauer mit Insulin und dem Insulinantikörpertiter keine direkten Beziehungen feststellen. Weder die intravenöse Applikation von Sulfonylharnstoff-Derivaten noch die *in vitro*-Applikation vermochte den Insulinantikörpertiter wesentlich zu verändern (s. Tab. I). Auch zwischen dem Blutzuckerverhalten und der Insulinbindungsfähigkeit des Serums nach intravenöser Applikation von 1 g Sulfonylharnstoff ließ sich keine Korrelation feststellen. Die Bindung exogenen J¹³¹-Insulins an Serumeiweißkörper wird im *in vitro*-Versuch nicht beeinflußt.

TABELLE I

Ergebnisse der Insulinantikörperbestimmung mit Hilfe der Differentialadsorptionsmethode nach Kerp an dem von uns untersuchten Krankengut von insgesamt 149 Patienten

Diagnose	Fälle	Titer in ml			Titer nach Sulfonylharnstoff- bzw. Glycodiazinbelastung (ml)		
		> 1-0,8	0,8-0,3	< 0,3	> 1-0,8	0,8-0,3	< 0,3
Normalpersonen	11	10	1		7	1	
Dysproteinämie	20	18	2		9	1	
Latenter Diabetes	3	3			3		
Leichter Diabetes	25	23	1	1	5		1
Mittelschwerer Diabetes	68	62	3	3	5		
Schwerer Diabetes	21	14	4	3	1	3	
Insulinresistenter Diabetes (tägl. 500 Einh. Insulin)	1		1				

Die Titer, gemessen in ml, wurden in drei Bereiche eingeteilt: > 1—0,8 ml = geringe Insulinbindungsfähigkeit, 0,8—0,3 ml = mittlere Insulinbindungsfähigkeit, < 0,3 ml = erhöhte Insulinbindungsfähigkeit. Titer höher als 0,36 ml kommen bei Normalpersonen vor. Titer unter 0,36 ml entsprechen dem Serum eines insulinbehandelten Diabetikers. Ein Titer unter 0,01 ml findet man bei insulinresistenten Diabetikern.

Diskussion

Die von uns bestimmten Insulinantikörpertiter lagen bei den einzelnen Diabetikergruppen etwa im gleichen Bereich, wie sie von Kerp u. Mitarb. (14, 15) angegeben worden sind. Proteine, die eine signifikant höhere Affinität zum Insulin besitzen und damit als Insulinantikörper zu bezeichnen sind, sind nach den vorliegenden Ergebnissen nur selten die Ursache für eine Insulinresistenz. Der Prozentsatz an Patienten, die auf Insulininjektionen hyperergisch reagieren, liegt demgegenüber wesentlich höher (19, 21, 35). Man muß infolgedessen annehmen, daß die applizierten Insuline zumindest für den Menschen eine geringe Antigenität besitzen (33). Hierfür spricht auch, daß keine Beziehungen zwischen der Dauer der Insulinapplikation und den gemessenen Antikörpertitern festgestellt werden konnten. Es müssen somit besondere Faktoren hinzukommen, die im Einzelfall eine spezifische Insulinresistenz hervorrufen (22, 28). In diesem Zusammenhang verdient der Hinweis von Pfeiffer (25) Bedeutung, wonach sogar gegen das eigene Insulin Antikörper gebildet werden können.

Ein wichtiges Problem im Rahmen der Diabetestherapie stellt die Frage nach dem Wirkungsmechanismus der Sulfonylharnstoffderivate dar (18). Die Liberierung biologisch wirksamen Insulins aus den β -Zellen des Pankreas durch diese Derivate ist allgemein bekannt (25). Es wird diskutiert, daß Sulfonylharnstoffe (13, 26, 30) einen Einfluß auch auf die Insulineiweißbindung in der Peripherie entfalten können. Mit Hilfe der angewandten Methodik konnte jedoch weder *in vivo* noch *in vitro* ein derartiger Effekt bestätigt werden.

Zusammenfassung

Bei 115 insulinbehandelten Diabetikern wurde der Insulinantikörpertiter nach der Methode von Kerp u. Mitarb. (14, 15) insbesondere auch in dysproteinämischen Seren und nach Sulfonylharnstoff- und Glycodiazinapplikation untersucht. Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse fand sich weder ein Zusammenhang zwischen der Insulinbindungsfähigkeit eines Serums und einer Dysproteinämie, noch gelang es, durch intravenöse Sulfonylharnstoff- bzw. Glycodiazinapplikation bei den einzelnen Patienten oder durch Zusatz von Glycodiazin zu deren Seren *in vitro* eine wesentliche Titerveränderung nachzuweisen. Ein Einfluß der Sulfonylharnstoffe auf die Insulineiweißbindung ist somit unwahrscheinlich. Korrelationen zwischen Insulindosis und Behandlungsdauer einerseits und Antikörpertiter gegen Insulin andererseits konnten nicht festgestellt werden.

Summary

The titer of antibodies to insulin was studied by the method of Kerp et al. (14, 15) in 115 insulin-treated diabetics, especially in dysproteinaemic sera and after administration of sulfonylurea and glycodiazine. The available results show neither a relationship between the insulin-binding capacity of a given serum and the presence of dysproteinaemia nor significant modification of the antibody titer by intravenous administration of sulfonylurea or glycodiazine or the addition of glycodiazine to the serum *in vitro*. It seems unlikely, therefore, that sulfonylurea exerts any influence on protein binding of insulin. Nor was any correlation found between the dose and duration of treatment with insulin and the titer of antibodies to insulin.

Literatur

1. Antoniadès, H. N.; Beigelman, P. M.; Tranquada, R. B. and Gundersen, K.: Studies on the state of insulin in blood: 'free' insulin and insulin complexes in human sera and their *in vivo* biological properties. *Endocrinology*, Springfield 69: 46 (1961).
2. Berson, S. A.; Yalow, R. S.; Bauman, A.; Rothschild, M. A. and Newerly, K.: Insulin- J^{131} metabolism in human subjects: demonstration of insulin-binding globulin in the circulation of insulin-treated subjects. *J. clin. Invest.* 35: 170-190 (1956).
3. Beyer, J.; Schöpfling, K.; Ditschuneit, H.; Melani, F.; Ammon, J. J.; Walter, A.; Althoff, P. und Pfeiffer, E. F.: Das Verhalten von Blutzucker, Seruminsulinwirkung und immunologisch nachweisbarem Insulin des hypophysectomierten und pankreatektomierten Hundes nach intravenöser Gabe von Glucose, Tolbutamid und Wachstumshormon. European Association for the Study of Diabetes-Abstracts. 1st Ann. Meet., Montecatini Terme, Italia 20. 4.-22. 4. 1965.
4. Brunfeldt, K.: Iodinated insulin preparations resolved by density-gradient electrophoresis. Reprint from *Science Tools* 12: 5-11, 17-24 (1964).
5. Daweke, H. and Bach, I.: Neue Erkenntnisse in der Behandlung der chronischen Insulinresistenz und experimentelle Untersuchungen zu ihrer Genese. *Klin. Wschr.* 41: 257 (1963).
6. Felber, J.-P.; Moody, A. J.; Villanueva, A. et Vannotti, A.: Détermination radio-immunologique de l'insuline et de l'ACTH en clinique. *Bull. Acad. Suisse Sci. Méd.* 21: 261 (1965).
7. Froesch, E. R. and Bürgi, H.: Antibody-suppressible and non suppressible insulin like activities in human sera and their physiological significance. *J. clin. Invest.* 42: 816 (1963).
8. Geerling, H. und Sirek, O. V.: Untersuchungen zur Bindung von J^{131} -Insulin an Serumproteine. 71. Tag. Dtsch. Ges. Inn. Med. Wiesbaden, 26.-29. 4. 1965.
9. Goetz, F. C.; Greenberg, B. Z.; Ellis, J. and Meinert, C.: A simple immunoassay for insulin: application to human and dog plasma. *J. clin. Endocrin.* 23: 1273 (1963).

10. Grodsky, G. M. and Forsham, P. H.: An immunochemical assay of total extractable insulin in man. *J. clin. Invest.* 39: 1070 (1960).
11. Hales, C. N. and Randle, P. J.: Immunoassay of insulin with insulin-antibody precipitate. *Biochem. J.* 88: 137 (1963).
12. Halpern, P.: Struktur und Antigenität des Insulins. *Diabet.-Kongr., Paris* 20.-22. 4. 1965, *Med. Ernährung-Sonderdruck Jg. 6:* 172-176 (1965).
13. Hasselblatt, A. und Schmieta, J.: Aktivierung von gebundenem Insulin durch Tolbutamid. *Med. Wschr. Jg. 17:* 910 (1961).
14. Kerp, L. und Steinhilber, S.: Quantitativer Nachweis insulinbindender Proteine durch Differentialadsorption. In: *Proteides of the Biological Fluids* (ed. H. Peters), vol. 11, p. 455 (Elsevier, Amsterdam/London/New York 1963).
15. Kerp, L.; Steinhilber, S. und Kasemir, H.: Ein Verfahren zum Nachweis insulinbindender Antikörper durch Differentialadsorption. *Klin. Wschr.* 44: 560 (1966).
16. Kerp, L. und Steinhilber, S.: Verbesserte Ultrazentrifugenmethodik zur quantitativen Untersuchung von Protein-Liganden-Komplexen. *Klin. Wschr.* 40: 540 (1962).
17. Kerp, L.: Untersuchung zur klinischen Bedeutung insulinbindender Antikörper. *Verh. Dtsch. Ges. Allergie-Immunitätsforsch. IX. Kongr. Bd. 1,* 1963.
18. Kramer, M.; Hecht, G.; Langdecker, H.; Harwart, A.; Richter, K.-D. und Gloxhuber, Ch.: Pharmakologie des 2-Benzolsulfonamido-5 (β -methoxyäthoxy)-pyrimidin (Glycodiazin), einer neuen blutzuckersenkenden Verbindung. *Arzneimittelforsch.* 14: 373-412 (1964).
19. Kühnau, J.: Insulinantagonisten, Insulinantikörper und ihre pathogenetische Bedeutung. *Der Internist* 5: 99-106 (1964).
20. Merimee, Th. J. and Hopkins, M. D. H.: Insulin resistance study of effect of 6-mercaptopurine. *Lancet* 69-71 (1965).
21. Michel, H.: Insulinallergie und Insulinresistenz. *Der Internist* 3: 728 (1962).
22. Moloney, P. J. and Coval, M.: Antigenicity of insulin: diabetes induced by specific antibodies. *Biochem. J.* 59: 179-185 (1955).
23. Morgan, C. R. and Lazarow, A.: Immunoassay of insulin: two antibody systems. *Diabetes* 12: 115 (1963).
24. Negri, M.; Sereno, L.; Isidori, A.; Greco, V. and Andreani, D.: Relationships between liver function and insulin metabolism. IV. *Congr. Féd. Int. de Diabète, Genève* 10.-14. 7. 1961.
25. Pfeiffer, E. F.: Probleme der Diabetestherapie 1962. Nach Vorträgen auf dem X. bzw. VII. internationalen Lehrgang für praktische Medizin der Bundesärztekammer vom 11.-24. März 1962 in Davos bzw. Bad Gastein.
26. Pfeiffer, E. F.: Über die biologische Bedeutung des Transportes und der Eiweißbindung von endogenem und exogenem Insulin im Blut. *Materia Med. Nordmark XVII/16,* 1965.
27. Rosselin, G.; Tchobroutsky, G.; Assan, R.; Lellouch, J.; Dolais, J. et Derot, M.: Etude quantitative d'anticorps humains anti-insulines animales par la méthode Radio-Immunologique de Berson et Yalow. *Diabetologia* 1: 33-38 (1965).
28. Samaan, N.; Fraser, R. and Dempster, W. J.: The 'typical' and 'atypical' forms of serum insulin. *Diabetes* 12: 339-348 (1963).
29. Scheiffarth, F.; Frenger, W. und Möckel, G.: Serologische Studien über das

- Wesen der Insulin-Antikörper. Dtsch. Med. Wschr. Jg. 84/5: 177-180 (1959).
30. Schwarz, K. und Bottermann, P.: Das Verhalten der Insulinaktivität, der Glucosetoleranz und der Fettmetaboliten im Serum bei der Adipositas nach Glucose- und Sulfonylharnstoffgabe. European Ass. Study of Diabetes-Abstracts. 1st Ann. Meet., Montecatini Terme, Italia 20.-22. 4. 1965.
 31. Stavitsky, A. B. und Arquilla, E. R.: Insulinantikörper und ihre klinische Bedeutung. Klin. Wschr. 36: 341 (1958).
 32. Vallance-Owen, J.: Insulin antagonism in the plasma of obese diabetics and prediabetics. Lancet i: 806-807 (1961).
 33. Wassermann, P.; Broh-Kahn, R. H. and Mirsky, I. A.: The antigenic property of insulin. J. Immunol. 38: 213-219 (1940).
 34. Weist, F.; Scheiffarth, F.; Zicha, L.; Wolf, F. und Schnell, K.: Glycodiazin, ein orales Antidiabetikum und seine Einwirkung auf die Insulineiweißbindung. (In Vorbereitung.)
 35. Wolf fromm, R.: Insulinallergie. Diabetes-Kongr., Paris 20.-22. April 1965.
 36. Yalow, R. S. et Berson, S. A.: Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. J. clin. Invest. 39: 1157 (1960).

Adresse der Autoren: Prof. Dr. F. Scheiffarth, Dr. F. Weist, Dr. H. Warnatz und Dr. K. Schnell, Abteilung für klinische Immunologie des Universitätskrankenhauses, Krankenhausstraße 12, Erlangen-Nürnberg (Deutschland).

L e b e n s l a u f

Am 3. August 1940 wurde ich als Tochter des technischen Angestellten Artur Schnell und seiner Ehefrau Emilie, geb. Buchholz, in Königsberg/Preußen geboren.

1946 trat ich in die Grundschule in Gotha/Thüringen ein. Nach Beendigung der Grundschule besuchte ich die Oberschule zu Gotha. und bestand dort am 9.6. 1959 das Abitur. Danach wurde ich in die Medizinische Fachschule in Erfurt aufgenommen.

Nach dem Tode meiner Mutter kam ich in die Bundesrepublik und bestand nach einem sechmonatigen Aufenthalt im Wichernstift Adelheide, Delmenhorst-Elmeloh, im Oktober 1960 die Anerkennungsprüfung zu meinem Reifezeugnis.

Im November 1960 begann ich mit dem Medizinstudium an der Georg-August-Universität in Göttingen. Die naturwissenschaftliche Prüfung legte ich nach dem Sommersemester 1961 ab und das Physikum bestand ich im August 1963. Seit Oktober 1963 bin ich an der Friedrich-Alexander-Universität in Erlangen immatrikuliert.

Am 10. März 1967 bestand ich die ärztliche Prüfung.

